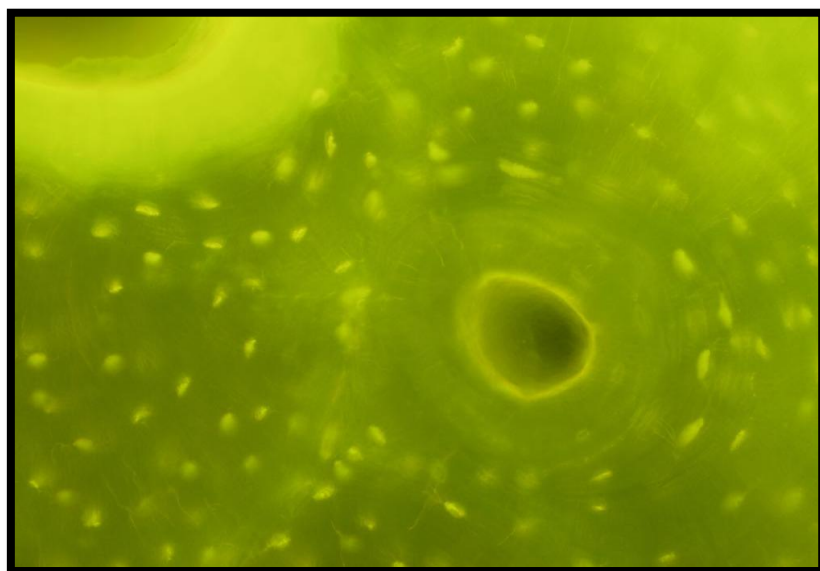




UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS

EL CONOCIMIENTO DE LAS POBLACIONES DEL PASADO
A TRAVÉS DE LOS RESTOS ÓSEOS:

ANÁLISIS PALEOHISTOLÓGICO SOBRE HUESOS LARGOS ARQUEOLÓGICOS.



PROYECTO FIN DE CARRERA
BIOLOGÍA EVOLUTIVA Y BIODIVERSIDAD

CARMEN NACARINO MENESES

Madrid, junio 2011



ÍNDICE

	Página
1. INTRODUCCIÓN	2
a) Estructura biológica del tejido óseo	2
b) El componente inorgánico del hueso como biomaterial	7
c) Tafonomía de huesos arqueológicos	8
2. OBJETIVOS	10
3. MATERIAL Y MÉTODOS	10
a) Material	10
b) Métodos	11
4. RESULTADOS	13
a) Aproximación histológica al tejido óseo	13
b) Análisis del contenido mineral del tejido óseo	16
c) Preservación de hueso arqueológico	20
5. DISCUSIÓN	23
6. CONCLUSIONES	26
7. AGRADECIMIENTOS	27
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27

1. INTRODUCCIÓN

El tejido óseo es un tejido conjuntivo especializado compuesto por células y matriz extracelular. Su característica principal, que lo distingue de otros tejidos conjuntivos, es la mineralización de dicha matriz, haciendo que sea un tejido muy duro capaz de proveer de sostén y protección al organismo. Por las características minerales de la matriz extracelular sirve también como depósito de calcio (Ca^{2+}) y fosfato (PO_4^{3-}), por lo que, además, presenta una función metabólica (Ross y Pawlina, 2007). El tejido óseo es pues, un material bioproducido muy dinámico y resistente pero que presenta cierta elasticidad, ya que se remodela de manera continua y está sujeto a influencias hormonales, metabólicas y ambientales (Welsch, 2008).

Debido a las características anteriormente nombradas, el hueso puede ser estudiado desde diferentes puntos de vista: (a) el hueso como tejido biológico y sus características, tanto a nivel macroscópico como microscópico y (b) el hueso como material bioproducido. En nuestro campo de estudio, además, los huesos son restos arqueológicos, surgiendo la posibilidad de analizar los mismos desde un tercer punto de vista y estudiar así (c) la preservación del hueso.

a) Estructura biológica del tejido óseo.

El hueso es un tejido biológico compuesto por diferentes tipos celulares (10%) rodeados de una matriz (90%) de componentes orgánicos e inorgánicos. Se distinguen tres tipos celulares principales: osteoblastos, encargados de formar la matriz orgánica; osteocitos, u osteoblastos maduros, cuya función principal es mantener el hueso, si bien también controlan las concentraciones extracelulares de calcio y fósforo; y osteoclastos, los cuales reabsorben el hueso en ciertas depresiones denominadas lagunas de Howship (Little *et al.*, 2011).

El tejido óseo deriva del mesodermo, una de las tres hojas embrionarias que constituyen el embrión. Durante el desarrollo embrionario se distinguen dos modelos de osteogénesis (proceso de formación de hueso) si bien ambos implican la transformación de tejido mesenquimal en tejido óseo. Durante la osificación intramembranosa, el tejido mesenquimal es reemplazado de manera directa por el tejido óseo y sucede, por ejemplo, en los huesos craneales. Si por el contrario, las células mesenquimales se

diferencian en cartílago, y es este tejido el que es reemplazado por hueso, la osificación es de tipo endocondral, típica de huesos largos (Gilbert, 2003).

Macroscópicamente, el hueso se divide en hueso cortical y hueso esponjoso o trabecular (Figura 1A). El primero de ellos presenta un aspecto sólido en la periferia de los huesos individuales del esqueleto (Figura 1A, flechas rojas) (Welsch, 2008) con densidades entre 1,6 y 2,4 gr/cm³. Puede subdividirse en zona perióstica o externa, zona media, y zona endóstica o interna (Hillier y Bell, 2007). El hueso trabecular (Figura 1A, flechas blancas) es un sistema tridimensional de espículas óseas interconectadas (Welsch, 2008) y se puede encontrar, entre otros, en el interior del hueso (zonas epifisarias), en el canal medular (Hillier y Bell, 2007).

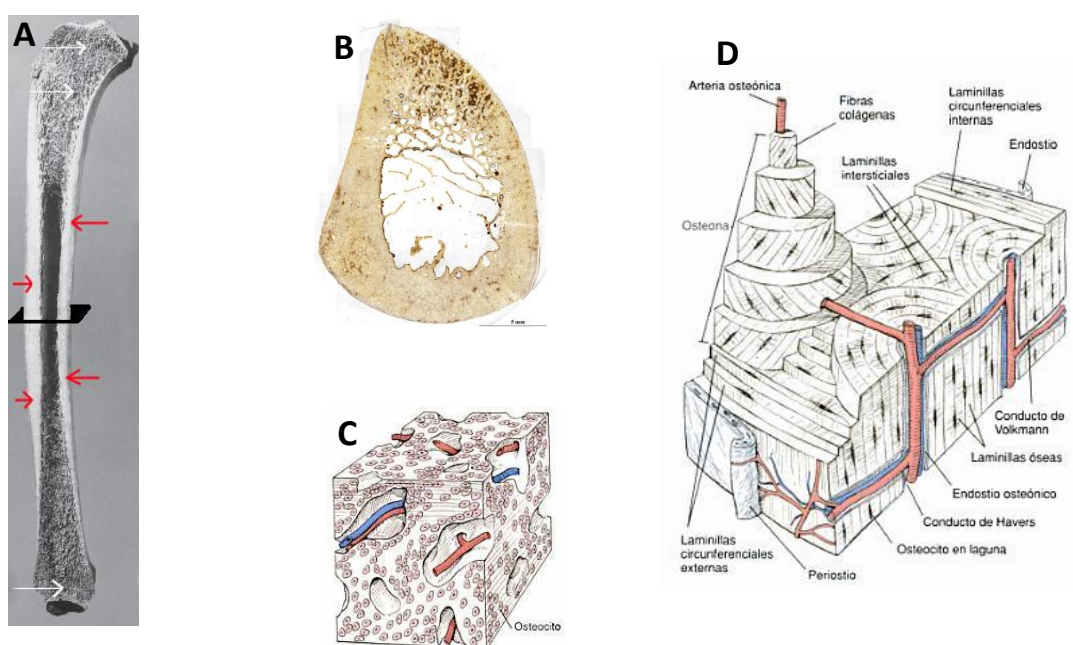


Figura 1.- Tipos de tejido óseo. **A)** Corte longitudinal de una tibia en la que se distingue hueso esponjoso (flechas blancas) y hueso cortical (flechas rojas) (Adaptado de White, 2005). **B)** Sección transversal de tibia a la altura de la mitad de la diáfisis. **C)** Esquema de la estructura del tejido óseo inmaduro donde se observa una disposición desordenada y aleatoria de los osteocitos (Adaptado de Ross y Pawlina, 2007). **D)** Esquema de la estructura del tejido óseo maduro donde se observa una estructura ordenada denominada sistema de Havers (Adaptado de Ross y Pawlina, 2007).

Microscópicamente, encontramos dos tipos de tejidos: maduro e inmaduro. El hueso inmaduro (Figura 1C) es temporal y se forma al inicio del crecimiento (en fetos e individuos infantiles) o en momentos de reparación ósea (Hillier y Bell, 2007). Presenta una disposición desordenada de las fibras de colágeno rodeando a los osteoblastos (Little *et al.*, 2011). El tejido maduro (Figura 1D) tiene, por el contrario, una estructura mucho más ordenada compuesta por fibras paralelas de colágeno y minerales asociados

(Hillier y Bell, 2007) tales como el fosfato de calcio ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) en forma de hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), carbonatos (CO_3^{2-}), magnesio (Mg^{2+}) o sodio (Na^+) (Welsch, 2008). Estas estructuras se conocen como laminillas o *lamellae* y, con un espesor de entre 3 y 7 μm , son las unidades estructurales del hueso maduro (Welsch, 2008).

Si atendemos a las estructuras histológicas presentes en el tejido, puede distinguirse un hueso primario de un hueso secundario. Así, el hueso primario es el primero que se deposita y contiene osteonas primarias, es decir, estructuras formadas por canales vasculares rodeadas por láminas concéntricas de hueso (Hillier y Bell, 2007) que no presentan línea de cemento (Locke, 2004). Este primer hueso depositado puede presentar diversas formas, pero las más comunes son laminar y plexiforme (del inglés *plexiform*), si bien en humanos el segundo aparece en muy baja o escasa frecuencia ya que es típico de mamíferos de rápido crecimiento como bóvidos o suidos (Hillier y Bell, 2007). El hueso laminar, característico de grandes mamíferos, reptiles y anfibios, se dispone en bandas de entre 4 y 20 láminas entre la red capilar del hueso (Locke, 2004).

El hueso secundario (Figura 1D) es tejido maduro que se deposita tras la reabsorción previa de hueso primario. Este tipo de hueso también es conocido como hueso haversiano, ya que presenta unas estructuras características denominadas osteonas o sistemas de Havers, constituidos por anillos de laminillas organizados alrededor de un canal central (canal de Havers) en cuyo interior se encuentran vasos sanguíneos y nervios (Hillier y Bell, 2007). Las osteonas pueden presentar numerosas formas y un diámetro entre 100 y 400 μm (Welsch, 2008), además de estar aisladas mediante líneas de inversión o líneas de cemento, resultado del cese de la reabsorción y el depósito de hueso nuevo (Hillier y Bell, 2007). Las líneas de cemento, con un grosor medio de 5 μm , son características de las osteonas secundarias. Aunque su composición y potenciales funciones no son bien conocidas, se sabe que participan en los procesos de fractura, absorción de energía y propiedades elásticas del hueso (Skedros *et al.*, 2005). La conexión entre osteonas está mediada por unas estructuras perpendiculares, los canales de Volkmann (Hillier y Bell, 2007) y, dentro de una misma osteona, los anillos se comunican mediante las extensiones citoplasmáticas de los osteocitos conocidas como canaliculos (Little *et al.*, 2011). Además de los sistemas de Havers, en el hueso secundario aparecen otras estructuras tales como las laminillas intersticiales (presentes en los espacios entre osteonas), las laminillas circunferenciales externas (en la zona

perióstica de la cortical) y las laminillas circunferenciales internas (en la zona endóstica de la cortical), todas ellas derivadas del hueso laminar primario (Locke, 2004).

Sin embargo, estas estructuras no permanecen inalterables a lo largo de la vida, sino que el hueso va sufriendo numerosos cambios en su tamaño, forma y organización histológica a través de los procesos de crecimiento, modelado y remodelación (Robling y Stout, 2008; Goldman *et al.*, 2009). El proceso de modelado está definido por Enlow (1962, 1963, 1982, 1996; citado en Goldman *et al.*, 2009) como los patrones de deposición y reabsorción de hueso en superficies complementarias de hueso, mientras que en el proceso de remodelación la reabsorción y deposición ósea ocurre en el mismo lugar (Enlow, 1963; citado en Goldman *et al.*, 2009).

Los procesos de crecimiento y modelado ocurren de manera simultánea durante el crecimiento de los huesos largos del individuo. Así, estos huesos aumentan en longitud y diámetro de manera fija y definida genéticamente, pero es el proceso de modelado el que determina la forma y curvatura óptima del hueso en función de las necesidades del organismo. Es también este proceso el encargado de transformar el tejido primario en secundario (Robling y Stout, 2008). Cuando todo el hueso primario ha sido sustituido por hueso haversiano, los procesos de crecimiento y modelado quedan en segundo plano dando paso al proceso de remodelación (Robling y Stout, 2008). La remodelación es llevada a cabo por las BMUs (del inglés, “basic multicelular units”), unidades encabezadas por osteoclastos encargados de la eliminación del tejido, y seguidas por osteoblastos que depositan tejido nuevo en respuesta a determinados estímulos (Little *et al.*, 2011). Así, las osteonas se forman mediante la deposición centrípeta de colágeno en las paredes de los espacios de reabsorción y su posterior mineralización, hasta alcanzar un tamaño crítico de diámetro, momento en que cesa dicho proceso (Sedlin y Frost, 1963). Mediante este mecanismo, el proceso de reabsorción queda restringido a un lado de la osteona y el depósito de hueso al lado contrario por lo que el canal de Havers queda colocado excéntricamente con respecto a la estructura general, simulando una deriva transversal osteónica hacia el canal medular del hueso (Epker y Frost, 1965). Es importante destacar pues, que si bien el proceso de remodelación es atribuido generalmente al hueso adulto, algunos autores como Amprino y Bairati en 1936 (citado en Burton *et al.*, 1989), o Burton en 1989 consideran que también es observable en individuos perinatales o infantiles (Burton *et al.*, 1989).

Estos procesos de modelado y remodelación han llevado a algunos autores a asociar la edad de los individuos con la estructura microscópica ósea, y con ello intentar buscar métodos para la estimación de la edad en el momento del fallecimiento. Algunos de los trabajos más relevantes en este campo pertenecen a Kerley (1965), Ahlqvist y Damsten (1969), Singh y Gunberg (1970), Thompson (1979) o Stout y Paine (1991). Cada uno de los trabajos considera importantes diferentes estructuras histológicas, elige áreas de muestreo distintas en cuanto a tamaño, número y localización en la cortical del hueso, y toma las medidas en uno o varios huesos. Así, Kerley (1965) cuenta el número de osteonas, el número de canales no haversianos y el porcentaje de hueso sin remodelar en cuatro campos de $2,06 \text{ mm}^2$ distribuidos entre la parte anterior, posterior, medial y lateral del corte; Ahlqvist y Damsten (1969) en un intento por simplificar el modelo anterior basan su método en el estudio del porcentaje de hueso remodelado en cuatro áreas de 1 mm^2 localizadas en lugares diferentes de los propuestos por Kerley (1965); Singh y Gunberg (1970) miden, en áreas de un 1 cm^2 de la parte anterior de la tibia, del fémur y del borde posterior de la rama mandibular el número de osteonas, el número medio de laminillas por osteona y el diámetro medio de los canales de Havers; Thompson (1979) intenta definir un método en el que la destrucción del hueso sea mínima, por lo que solo requiere la extracción de una porción de hueso de $0,4 \text{ mm}$ de diámetro sobre la cual mide 19 variables; Stout y Paine (1991) basan su estudio en el recuento de las osteonas por milímetro cuadrado en todo el corte histológico para la sexta costilla y la clavícula (citado en Stout, 1992).

No obstante, y tal como indicó Frost en 1987, los procesos de crecimiento, modelado y remodelación, además de verse modulados con la edad, presentan una fuerte influencia de otros factores tales como el sexo del individuo, la actividad física o las diferentes estructuras histológicas y su proporción dentro del mismo hueso. Actualmente no hay estudios que aseguren con certeza que la histología presenta signos de dimorfismo sexual, mientras que los otros dos factores sí han sido estudiados con más profundidad (Robling y Stout, 2008). La actividad física queda reflejada en la estructura histológica del hueso en forma de microfisuras. Estas se forman como resultado de las discontinuidades presentes en el hueso (O'Brien *et al.*, 2005), como las existentes entre las láminas de las osteonas o aquellas causadas por otros factores como la porosidad, mineralización y otros aspectos de la estructura histológica ósea (Mohsin *et al.*, 2006). Sin embargo, estas discontinuidades juegan un doble papel, ya que

también actúan como barreras a la propagación de las microfisuras (Martin *et al.* 1998, citado en Mohsin *et al.*, 2006; O'Brien *et al.*, 2005). Lo que sí está claro con respecto a las microfisuras es que actúan como estímulo para la remodelación (O'Brien *et al.*, 2005; Mohsin *et al.*, 2006). Igualmente, la diferente proporción de estructuras histológicas está relacionada con la actividad física. Bell *et al.* en 2001 (citado en Pfeiffer *et al.*, 2006) propusieron que una mayor densidad de osteonas pequeñas disminuía la probabilidad de propagación de las microfisuras, de tal manera que osteonas más grandes eran más propensas a las mismas (Martin, 2000, 2002, 2003; citado en Pfeiffer *et al.*, 2006). Esto implica una variabilidad de estructuras histológicas entre los diferentes huesos del cuerpo ya que aquellos que soportan más carga presentarán una mayor variabilidad en cuanto al tamaño osteónico (Pfeiffer *et al.*, 2006). Existe también una variabilidad dentro del mismo hueso ya que la fuerza no se soporta por igual en todas las zonas de la cortical (Chan *et al.*, 2007).

b) El componente inorgánico del hueso como biomaterial.

El tejido óseo puede considerarse un material bioproducido, es decir, un composite (material compuesto de varios elementos) formado por una fase orgánica y una fase inorgánica con una estructura altamente jerárquica (Peters *et al.*, 2000). La parte orgánica está compuesta, en un 90%, por fibrillas de colágeno tipo I y, en un 10%, por otras proteínas tales como osteocalcina, osteonectina u osteopontina (Welsch, 2008). La parte mineral, está formada por fosfato de calcio carbonatado conocido de manera general como hidroxipatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) (Carden y Morris, 2000) y en menor medida por fosfato cálcico ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) (Little *et al.*, 2011). Ambos minerales, en la actualidad, son fundamentales en la investigación de biomateriales cerámicos utilizados en implantes óseos (de Aza *et al.*, 1997).

La parte mineral del tejido óseo confiere rigidez a los huesos y dientes, una propiedad indispensable en el desarrollo de las funciones biomecánicas de los mismos (Penel *et al.*, 2000). Se conocen tres aspectos distintos que afectan a las propiedades biomecánicas del hueso: el grado de mineralización (relación entre cantidad de mineral y cantidad de colágeno), el grado de cristalinidad (o grado de orden de los cristales que forman el mineral) y la sustitución de iones (Caeiro-Rey *et al.*, 2006). Por esta razón, estudiando la fase mineral del hueso podremos determinar sus propiedades mecánicas, cristalográficas y fisicoquímicas (Elliot, 1994; citado en Penel *et al.*, 2000). A partir de

estos resultados podremos inferir información biológica acerca de cambios relacionados con la edad (Akkus *et al.*, 2003) o con patologías (Caeiro-Rey *et al.*, 2006).

Los métodos más comunes de caracterización química de la zona mineral del hueso son análisis de ultrasonidos, diferentes tipos de microscopía electrónica, difracción de rayos X y microanálisis en espectroscopía RAMAN e Infrarroja (Bres 1986, 1993, Gadaleta, 1996; citado en Penel *et al.*, 2000). En general, la espectroscopía vibracional, como es el caso de RAMAN e Infrarrojos, es una herramienta muy útil para el examen de este tipo de tejidos (Caeiro-Rey *et al.*, 2006), ya que proporciona información espacial además de la información facilitada por las otras técnicas como la geometría o densidad del hueso (Gourion-Arsiquaud *et al.*, 2009). La espectroscopía es una técnica basada en el análisis del espectro de luz emitido por una sustancia en respuesta a la excitación del mismo provocada por una luz visible, como por ejemplo, un láser. Los fotones, al ser excitados, interaccionan con las moléculas de la muestra a través del fenómeno de dispersión RAMAN, convirtiendo la energía del fotón de luz en vibración molecular (Akkus *et al.*, 2003). La espectroscopía RAMAN tiene una serie de características que hacen que sea de gran utilidad, ya que no requiere una preparación especial de la muestra (metodología no destructiva) y proporciona espectros sencillos y completos en poco tiempo debido al uso de láseres como fuente de excitación (Caeiro-Rey *et al.*, 2006). Esta técnica nos permite, por tanto, identificar de manera bastante precisa el estado de una molécula o de un cristal (Carden y Morris, 2000), dato que podremos utilizar para obtener información biológica como la comentada anteriormente. Además, la espectroscopía RAMAN ha sido utilizada para comparar restos arqueológicos y actuales (Carden y Morris, 2000).

c) Tafonomía de huesos arqueológicos.

Por último, y debido a que el material de estudio de este trabajo procede de un contexto arqueológico, debemos analizar todas las posibles transformaciones tafonómicas a las que haya podido estar sometido el hueso.

Así, la Tafonomía se define como la disciplina científica que estudia las leyes del enterramiento, es decir, todo lo relativo a la transición de los organismos presentes en la biosfera a la litosfera o al registro geológico (Lyman, 1994). Esta disciplina científica, a su vez, se compone de dos subdisciplinas: Bioestratonomía y Diagénesis. La primera de ellas engloba los procesos transcurridos previos al enterramiento,

mientras que la segunda estudia los sucesos posteriores a este acontecimiento. Sin embargo, el límite entre ambas subdisciplinas no es tan evidente como podría parecer. En la actualidad se establece la muerte como el comienzo de las dos fases, si bien la fase diagenética es menos intensa que la bioestratinómica hasta el inicio del enterramiento (Cambra-Moo, 2006). La Bioestratinomía se centra, por tanto, en el estudio de los factores ambientales que afectan a los restos del organismo desde su muerte hasta su enterramiento final (putrefacción o descomposición, desarticulación, transporte, etc.) (Lyman, 1994), mientras que la Diagénesis analiza las alteraciones químicas y físicas ocurridas en los restos con posterioridad a su enterramiento a una escala macroscópica y microscópica (Cambra-Moo, 2006). Durante la Diagénesis se producen una serie de cambios en la composición química y morfológica de los huesos (Pfretzschner, 2004). La hidroxiapatita mantiene su estructura geométrica durante la fosilización pero está sujeta a la sustitución isomórfica, es decir, a cambios en su composición química (Stout, 1978). Este mineral sufre un reemplazo químico por sustancias inorgánicas, quedando alterada por procesos de recristalización y sustitución del grupo OH^- y PO_4^{3-} por Cl^- , F^- , y CO_3^{2-} , transformándose de esta manera en fluorapatita altamente carbonatada (Pfretzschner, 2004). Por otro lado, el colágeno parece ser el mayor componente orgánico que persiste en hueso antiguo (Stout, 1978). Debido a esto y en función de los cambios químicos que va sufriendo el hueso, el proceso de fosilización se puede dividir en dos fases: diagénesis temprana y diagénesis tardía. En la primera, las condiciones químicas del medio están controladas por la presencia conjunta de la hidroxiapatita y fosfato, mientras que en la tardía, solo se debe a la hidroxiapatita. Además, en la primera etapa se precipitan fundamentalmente sulfuros, mientras que en la segunda las reacciones son dependientes de pH. También, en el segundo caso, las reacciones son mucho más lentas. La primera fase de la diagénesis puede ser dividida a su vez en tres pasos: un primer paso caracterizado por la acción microbiana; un segundo paso en el que lo más importante es el deterioro del colágeno; y un tercer paso donde el colágeno es finalmente sustituido por apatita y otros minerales (Pfretzschner, 2004)

Los huesos arqueológicos han sido expuestos a estos procesos al ser sometidos a un enterramiento, pudiendo haberse visto alterada su estructura y composición. Es importante pues, que el paleohistólogo distinga los cambios producidos en la estructura del hueso durante la vida del organismo de aquellos ocurridos postmortem. Así, la

estructura histológica de restos arqueológicos se encuentra, por lo general, bien preservada (Stout, 1978).

2. OBJETIVOS

- Desarrollar un método de preparación de láminas delgadas de hueso arqueológico para la observación en microscopía óptica de transmisión.
- Estudiar, desde un punto de vista biológico, las características histológicas del tejido óseo a partir de huesos arqueológicos y con ello intentar encontrar indicadores válidos para la estimación de la edad.
- Analizar la parte mineral del hueso arqueológico desde una perspectiva biomaterial, para conocer su estructura y composición química y aportar datos de interés al campo de estudio de los biomateriales.
- Examinar las transformaciones tafonómicas microscópicas presentes en dichos huesos de tal manera que se amplíe la información conocida hasta el momento acerca de la preservación de la colección estudiada.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

a) Material

La colección de trabajo es un osario procedente de Almansa (Albacete) datado entre los siglos XIII y XVIII. Los restos óseos fueron encontrados cerca de la antigua iglesia medieval de Santa María de la Soledad y podrían corresponder a los enterramientos de este templo.

Para nuestro estudio se han seleccionado 4 tibias izquierdas correspondientes a 4 individuos diferentes pertenecientes a 3 grupos de edad, en función del grado de fusión de las epífisis (Scheuer y Black, 2000): infantil, juvenil y adulto.

b) Métodos

– Preparaciones de lámina delgada

El procedimiento para la preparación de las muestras está basado en el propuesto por otros autores como Frost (1958) o Ubelaker (1974), si bien no es exactamente el mismo. Estas muestras han sido analizadas en microscopía óptica de transmisión y fluorescencia tal y como se detalla con posterioridad, de tal manera que la primera proporciona la información necesaria para la aproximación biológica del trabajo y la segunda aporta datos relativos a la preservación de los huesos estudiados.

Se realizó un corte en el punto medio de la diáfisis ± 2 cm de cada una de las tibias mediante una cortadora manual, obteniendo dos fragmentos transversales de hueso de 2 cm cada uno, ocho fragmentos en total. Cada uno de dichos fragmentos se embutió en resina (EpoFix Resin). Mediante una bomba de compresión al vacío se consiguió que la resina se introdujera por todos los poros del material. A la resina se le añadió un catalizador (EpoFix Hardener) y se dejó 24 horas para endurecer.

De cada uno de los fragmentos anteriormente descritos se obtuvieron cortes de 1 mm de espesor mediante una microcortadora (Figura 2A) (Buehler®. ISOMET™. Low speed saw. Lake Bluff. Illinois, USA). A partir de cada fragmento se realizaron 3 cortes, con lo que finalmente se consiguieron 24 láminas de 1 mm de ancho.

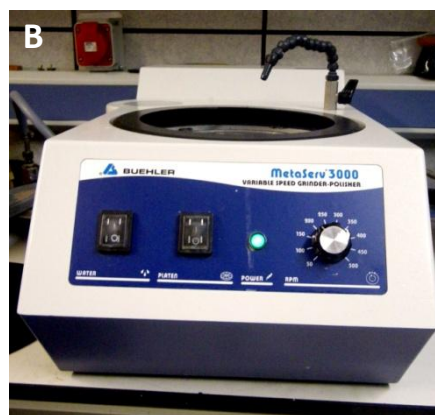


Figura 2.- Material utilizado para realizar los preparados para el microscopio óptico. **A)** Microcortadora de diamante. Buehler®, ISOMET™. **B)** Pulidora Manual Metaserv® 3000

Puesto que estas láminas iban a ser observadas al microscopio óptico el espesor máximo ha de ser de 100 μ m. Para conseguirlo se utilizó una pulidora manual (Metaserv® 3000. Variable speed grinder. Buehler ®) (Figura 2B). Utilizando una lija de carburo de silíceo de tamaño de grano 4000 μ m, se eliminaron las marcas producidas

por la microcortadora de una de las caras de los cortes. Dichas superficies se fijaron a unos portas mediante un adhesivo de montaje para superficies biológicas (DEPEX Mounting Media). Manualmente y mediante el uso de lijas de carburo de silíceo de tamaño de grano 320, 1200, 2500 y 4000 μm sucesivamente y a una velocidad media de 150 revoluciones por minuto (RPM) se consiguió un espesor de 100 μm en las láminas de hueso. El tiempo de uso de cada una de las lijas fue variable dependiendo del estado del corte, adecuándolo en cada caso al tipo de lija más conveniente.

De las láminas de 100 μm conseguidas se seleccionaron cuatro (una por cada una de las tibias) y se observaron en el microscopio óptico de transmisión (Olympus BX61). Mediante la cámara incorporada al microscopio (Olympus DP70) y un sistema de software de toma de imágenes (DP Controller 1.1.165., 2001-2002 ©, Olympus Optical CO., LTD), se fotografió de manera secuencial a un aumento de 4x, las secciones transversales de tibia de cada uno de los individuos. Posteriormente, mediante el editor de imágenes Photoshop (Adobe® Photoshop® CS4) se montaron las imágenes para lograr una única fotografía que representara la sección histológica de la tibia. Las medidas histomorfométricas se realizaron con el programa Image J®.

Las mismas láminas se observaron en fluorescencia con el mismo microscopio óptico (Olympus BX61) excitando con luz azul de longitud de onda 460-490 nm. En las mismas condiciones que en el caso anterior y con los mismos dispositivos, se procedió a la fotografía secuencial del corte de individuo juvenil. Igualmente se fotografiaron diferentes partes de los demás cortes para poder mostrar resultados generales.

– Preparaciones para Microscopía electrónica y Espectroscopía RAMAN

Por otro lado, cuatro de las ocho porciones embutidas en resina (una de cada individuo) fueron lijadas en una máquina de pulido automático (Phoenix® 4000. Sample preparation sistem. Buehler®) utilizando primero un paño de diamante incrustado de tamaño de partícula 20 μm durante 15 min a una velocidad de 100 RPM y, después, lijas de carburo de silíceo de tamaño de grano 2500 y 4000 μm durante 10 minutos cada una a la misma velocidad que en el caso anterior.

Las porciones de hueso embutidas en resina y posteriormente pulidas se sometieron a análisis en microscopía electrónica (Hitachi s-4700 SEM) y espectroscopía RAMAN.

4. RESULTADOS

Puesto que se han obtenido numerosos y complejos resultados, se propone una aproximación a los mismos desde tres puntos de vista: (a) un análisis de la histología e histomorfometría del hueso, (b) un estudio del contenido inorgánico del hueso y, por último, (c) la observación de transformaciones tafonómicas relacionadas con el estado de preservación.

a) Aproximación histológica al tejido óseo

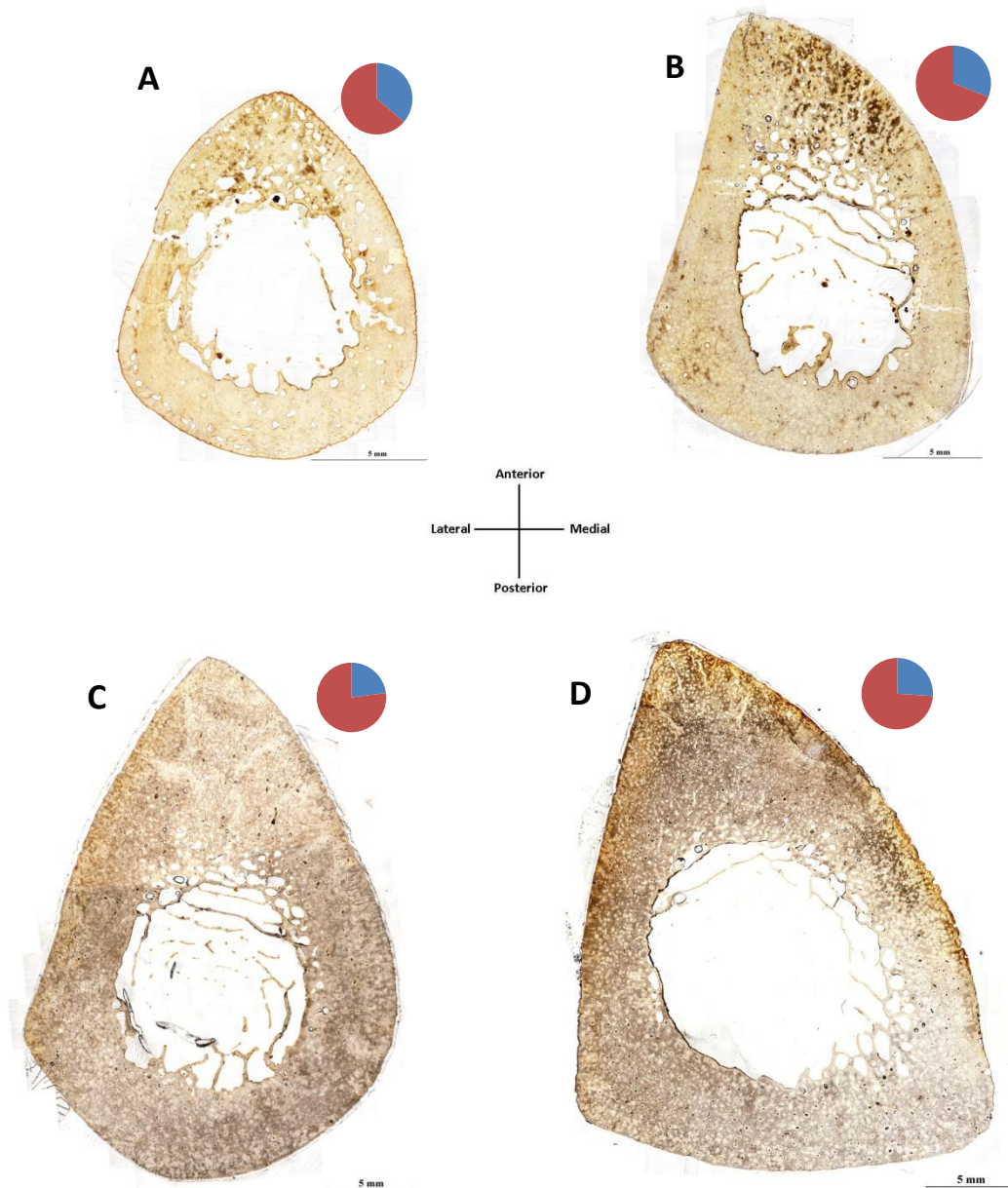


Figura 3.- Cortes histológicos de las tibias izquierdas de la población de Almansa. En el centro aparece un esquema representando la colocación de los cortes. En la esquina superior derecha de cada figura se muestra un gráfico que indica el porcentaje de cortical (rojo) y lumen (azul) de cada corte. **A)** Individuo Infantil (4x). **B)** Individuo Juvenil (4x). **C)** Individuo Adulto 1(4x). **D)** Individuo Adulto 2 (4x). Las líneas de escala representan 5 mm.

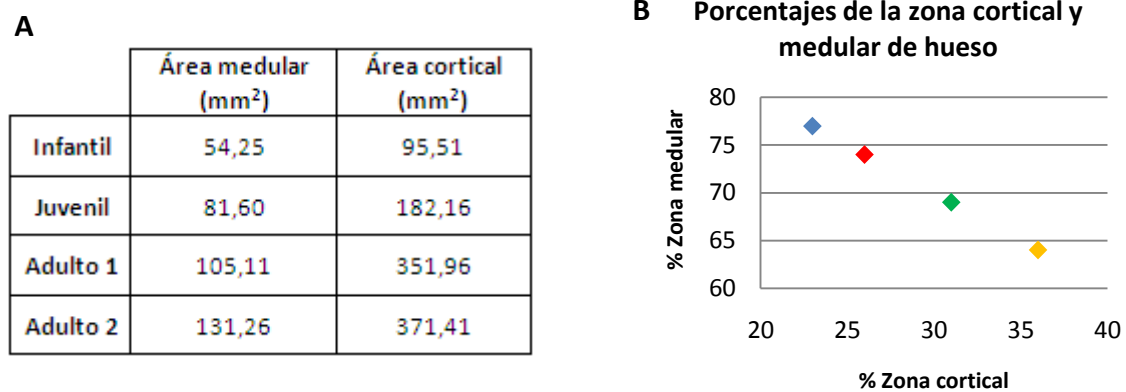


Figura 4.- Resultados histomorfométricos de las tibias izquierdas de la población de Almansa. **A)** Datos histomorfométricos de la zona cortical y medular. **B)** Representación gráfica de las proporciones de zona cortical y zona medular al total de corte. Azul = Individuo Infantil; Rojo = Individuo Juvenil; Verde = Individuo Adulto 1; Amarillo = Individuo Adulto 2

En primer lugar, durante la ontogenia se observa un aumento tanto en el área de la cortical como en el espacio medular del hueso (Figura 3; Figura 4A). El hueso infantil presenta un área cortical (95,51 mm²) menor que el hueso juvenil (182,16 mm²), y éste a su vez un área menor que ambos adultos (351,96 mm² y 371,41 mm², respectivamente). Lo mismo sucede con respecto al área del espacio medular del hueso, siendo menor en la muestra infantil (54,25 mm²) que en la muestra juvenil (81,60 mm²) y con valores máximos en el Adulto 1 y el Adulto 2 (105,11 mm² y 131,26 mm², respectivamente). Además, pueden verse diferencias en cuanto a la contribución de cada una de estas zonas al total del corte, observándose un aumento del área ocupada por la cortical con respecto a la ocupada por el espacio medular con la edad (Figura 4B). Así, en el individuo Infantil la cortical supone un 64% del total y el espacio medular un 36% del mismo, mientras que para el hueso juvenil la cortical ocupa un 69% y el espacio medular un 31%. En los individuos adultos la zona cortical representa aproximadamente las tres cuartas partes del corte (77% en el Adulto 1 y 74% en el Adulto 2) mientras que el lumen supone sólo un cuarto del total (23% en el Adulto 1 y 26% en el Adulto 2).

El hueso esponjoso o trabecular apenas está presente en los cortes (Figura 3). Si bien es posible que parte de él haya sido destruido mediante el proceso de preparación de las láminas delgadas, tal y como se observa en la figura 1A, el hueso esponjoso se localiza fundamentalmente en las epífisis del hueso. En la diáfisis de la tibia, lugar de estudio en este caso, no se observa hueso trabecular (Figura 1A).

Al estudiar la cortical del hueso se observa que, de manera global, el hueso infantil presenta una porosidad mucho más elevada que el hueso juvenil, y este a su vez que los individuos adultos (Figura 3).

La figura 5 nos muestra cómo, a lo largo de la ontogenia, el tejido óseo se va transformando. Esto queda manifestado en las diferentes estructuras histológicas que se observan para cada una de las edades estudiadas. Como queda reflejado en las Figuras 5A y 5B en el hueso infantil tan solo encontramos hueso primario en forma de osteonas primarias (OP) o de tejido laminar dispuesto en forma de bandas (LC). Además, los amplios espacios que se observan en el corte completo (Figura 3A) se corresponden con lagunas o espacios de reabsorción (ER), lo que indica que este hueso estaba sufriendo remodelación en el momento del fallecimiento. El individuo Juvenil (Figura 5C y 5D) presenta una estructura intermedia entre el anterior y lo observado en los ejemplares adultos, ya que aun se encuentran algunas osteonas primarias, pero la mayoría de la cortical está ocupada por osteonas secundarias (OS). Al igual que en el individuo Infantil, aparecen cavidades que se corresponden con áreas de remodelación ósea (Figura 5D), pero en este caso son menores en número y están prácticamente limitadas a la zona anterior de la tibia. Por último, ambos adultos tienen una estructura microscópica muy similar (Figuras 5E y 5F), con la mayor parte de la cortical ocupada por osteonas secundarias (OS). Los espacios de reabsorción aparecen como algo aislado, indicando, que si bien el hueso sigue en remodelación, la tasa es mucho menor.

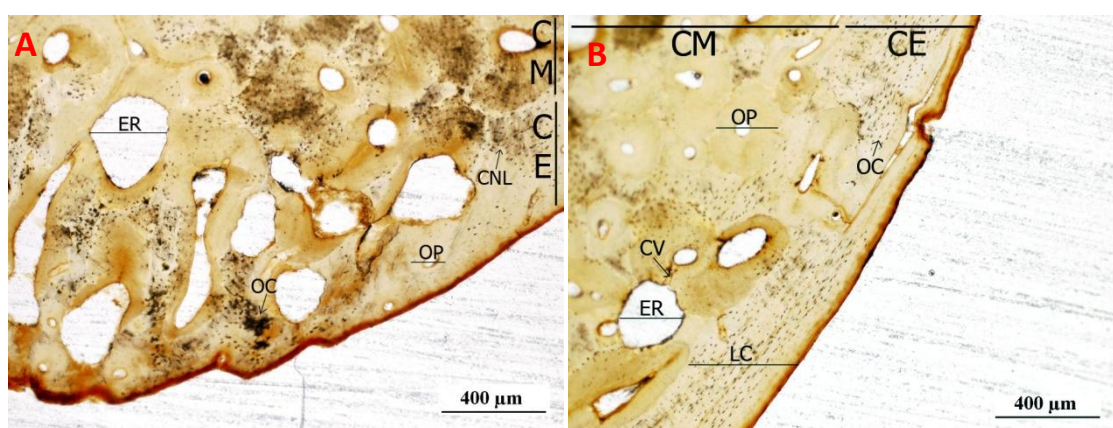


Figura 5.- Cortes histológicos en detalle de los individuos infantil, juvenil y adulto (4x). CE = Cortical externa; CM = Cortical media; CNL = Canaliculos; CV = Canal de Volkmann; ER = Espacio de reabsorción; LC = laminillas circunferenciales; OC = Osteocito; OP = Osteona primaria; OS = Osteona secundaria. **A)** Individuo Infantil. **B)** Individuo Juvenil. Las líneas de escala representan 400 µm.

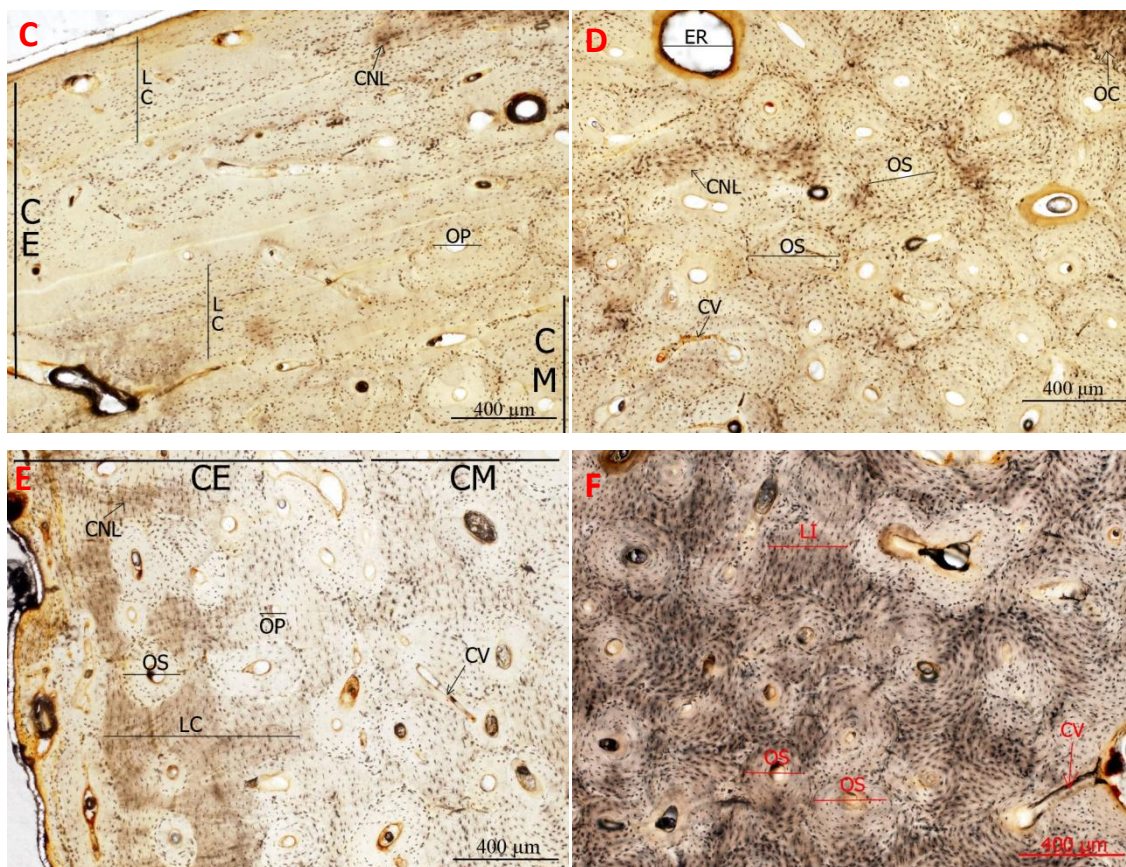


Figura 5 (Continuación).- C) Individuo Juvenil. D) Individuo Juvenil. E) Individuo Adulto 1. F) Individuo Adulto 2. Las líneas de escala representan 400 µm.

Se han observado además algunas zonas más oscuras, que en el individuo Infantil y Juvenil aparecen concentradas preferentemente en la parte anterior de la tibia (Figura 3). Al observarlas a mayor aumento (Figura 5), vemos que se corresponden con acúmulos de osteocitos (Figura 5A), por lo que podría tratarse de restos de tejido orgánico. Para ello se realizaron estudios posteriores que serán explicados y tratados más adelante.

b) Análisis del contenido mineral del tejido óseo.

Tal y como se comentó en la introducción, la parte inorgánica del tejido óseo se investiga, en el campo de los biomateriales, para la aplicación en implantes. En este trabajo se propone el análisis mediante espectroscopía RAMAN para analizar la parte mineral de las tibias del estudio. De manera general se puede observar que, en el transcurso de la ontogenia, el hueso presenta diferencias con respecto a su grado de cristalinidad (Figura 6). Esta información se obtiene a partir de la intensidad de emisión de los distintos componentes minerales (representada en el eje Y de las gráficas de la Figura 6), ya que una mayor intensidad en el espectro RAMAN indica menor

organización o cristalinidad. Es conveniente aclarar, que los espectros se encuentran bastante distorsionados debido a la elevada luminiscencia (propiedad de emitir luz sin elevación de la temperatura) que presenta la muestra. Esto hace que, al ser la señal muy grande, los picos de intensidad, correspondientes a cada uno de los minerales que conforman el hueso, no se diferencien con claridad, pudiendo apreciarse, sin embargo, diferencias en la intensidad de emisión entre los diferentes individuos y entre las distintas partes dentro del mismo hueso (Figura 6).

Así, se pueden encontrar diferencias entre las diferentes fases de la ontogenia. De manera general, el hueso perteneciente al individuo Infantil (Figura 6A) es menos cristalino en su estructura mineralógica que el hueso del individuo Juvenil (Figura 6B), y este menos ordenado o cristalino a su vez que ambos adultos (Figura 6C y Figura 6D).

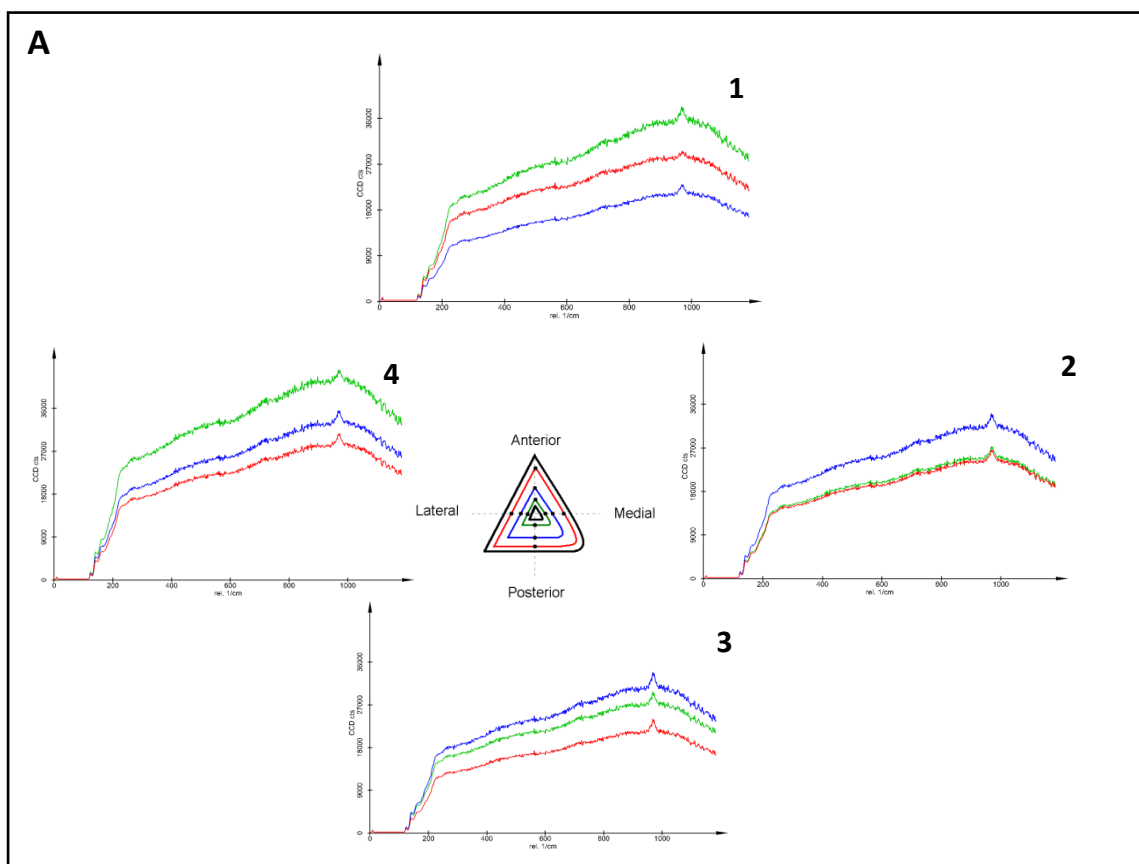


Figura 6.- Espectros RAMAN en el hueso cortical de las tibias de la colección de Almansa. En el centro aparece una representación esquemática de los puntos donde se ha realizado el análisis. Los números de la esquina superior derecha indican: 1=parte anterior de la tibia; 2= parte medial de la tibia; 3= parte posterior de la tibia; 4= parte lateral de la tibia. **A)** Individuo Infantil.

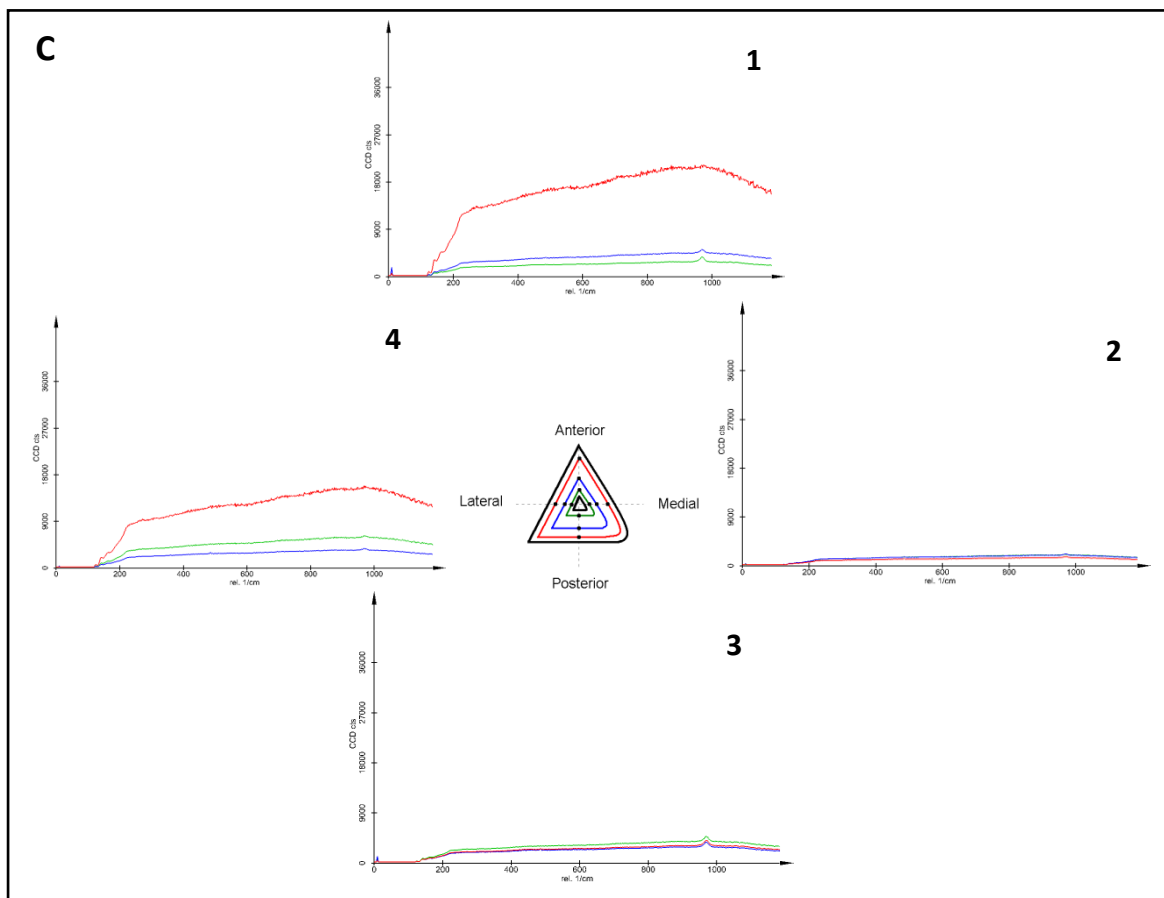
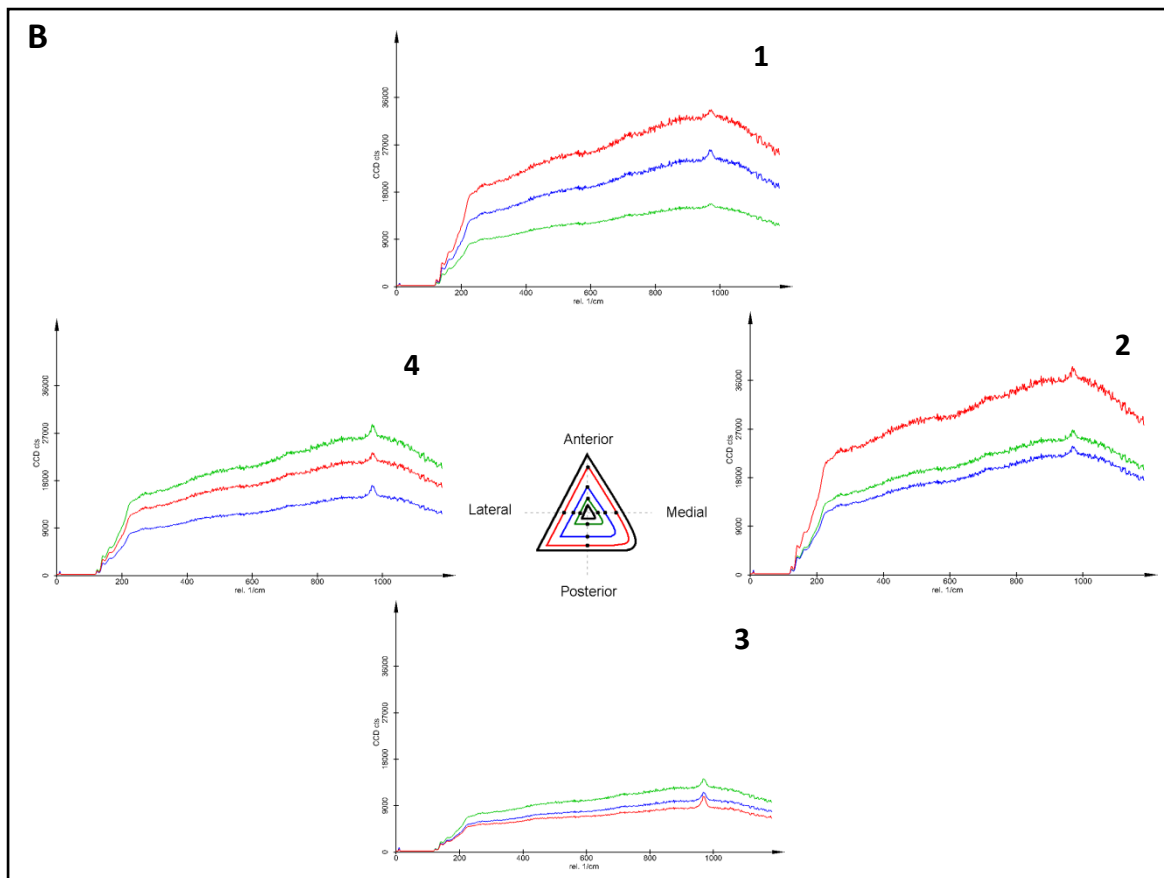


Figura 6 (Continuación).- B) Individuo Juvenil. C) Individuo Adulto 1

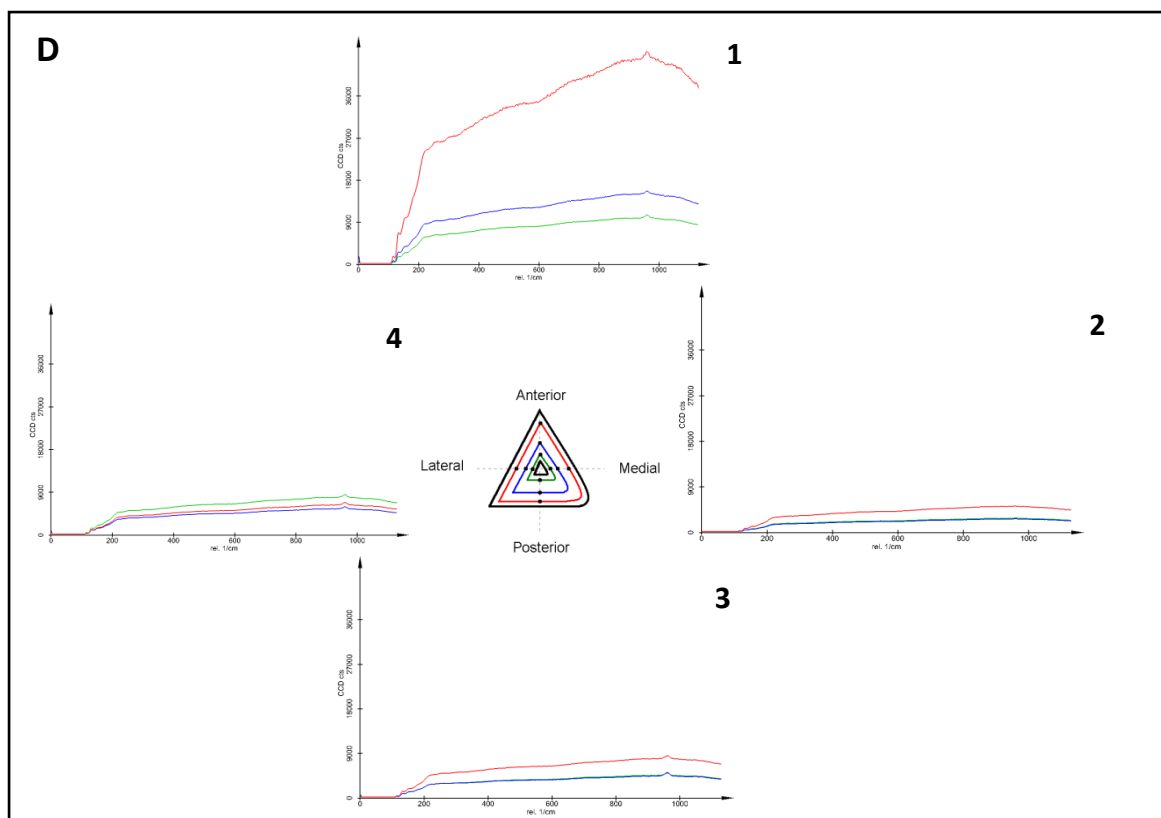


Figura 6 (Continuación).- D) Individuo Adulto 2

En lo relativo al individuo Infantil, se observan diferencias en las diferentes zonas del hueso. Por un lado, la cortical interna presenta la estructura más amorfa (menos cristalina) en la zona anterior (Figura 6A.1) y lateral (Figura 6A.4) de la tibia, mientras que en las zonas medial (Figura 6A.2) y posterior (Figura 6A.3), es la parte media de la cortical la que presenta menor organización.

Para el individuo Juvenil (Figura 6B) aparece una semejanza en cuanto a estructura amorfa de la cortical dos a dos, como para el caso anterior. Sin embargo, tanto las zonas de la tibia como las partes de la cortical difieren con las del caso del individuo Infantil (Figura 6A). En el individuo Juvenil, la zona externa de la cortical se corresponde con la estructura menos cristalina en la parte anterior (Figura 6B.1) y medial (Figura 6B.2) de la tibia. En las zonas lateral (Figura 6B.4) y posterior (Figura 6B.3) es la zona interna de la cortical la que muestra una estructura más amorfa.

Las gráficas correspondientes a los adultos (Figuras 6C y 6D) son bastantes similares entre sí, ya que ambas presentan, de manera aproximada, los mismos niveles de organización estructural. En ambas muestras resulta significativo el hecho de que la parte externa de la cortical es muy amorfa en la zona anterior de la tibia (Figura 6C.1 y

Figura 6D.1), en la espinilla. En el caso del Adulto 1, la parte externa de la cortical también es poco cristalina en la zona lateral (Figura 6C.4). En ambos individuos y en el resto de las zonas del hueso no comentadas, todas las partes de la cortical parecen tener una cristalinidad similar.

A pesar de que, como se ha comentado anteriormente, debido a la luminiscencia de la muestra no se diferencian con claridad los picos de intensidad correspondientes a los diferentes elementos que componen el hueso, en 960cm^{-1} si puede distinguirse la señal de un compuesto. Según la literatura analizada (Akkus *et al.*, 2003), este pico se corresponde con una banda de PO_4^{3-} perteneciente a la hidroxiapatita. Sin embargo, y a causa de la luminiscencia antes nombrada, la intensidad y forma de esta banda no puede ser analizada.

c) Preservación de hueso arqueológico.

Como se comentó en el primer apartado de los resultados, al estudiar la estructura histológica del tejido óseo se observaron unas zonas oscuras que, de manera general, se correspondían con los lugares ocupados por osteocitos y el interior de algunos de los canales de Havers. Para comprobar si estas acumulaciones están relacionadas con la preservación del tejido blando y para estudiar en mayor profundidad el estado de preservación del hueso, se han analizado las muestras mediante las técnicas de microscopía electrónica (SEM) y microscopía óptica de fluorescencia

Con la ayuda del microscopio electrónico (SEM) se observa cómo, en el entorno de una osteona (Figura 7A), hay una variación en cuanto a los elementos químicos presentes, entre la zona de las láminas concéntricas y el canal de Havers (flecha roja, figura 7A). Así, en la parte más externa se observan altas concentraciones de calcio y fósforo, componentes fundamentales de la hidroxiapatita (Figura 7B). Además, en la zona correspondiente al canal de Havers, donde en el estudio histológico se habían observado unas zonas más oscuras, el análisis químico revela un aumento en los niveles de carbono (Figura 7B) lo que podría estar indicando la presencia de parte de los tejidos blandos que hayan quedado preservados (posiblemente momificados).

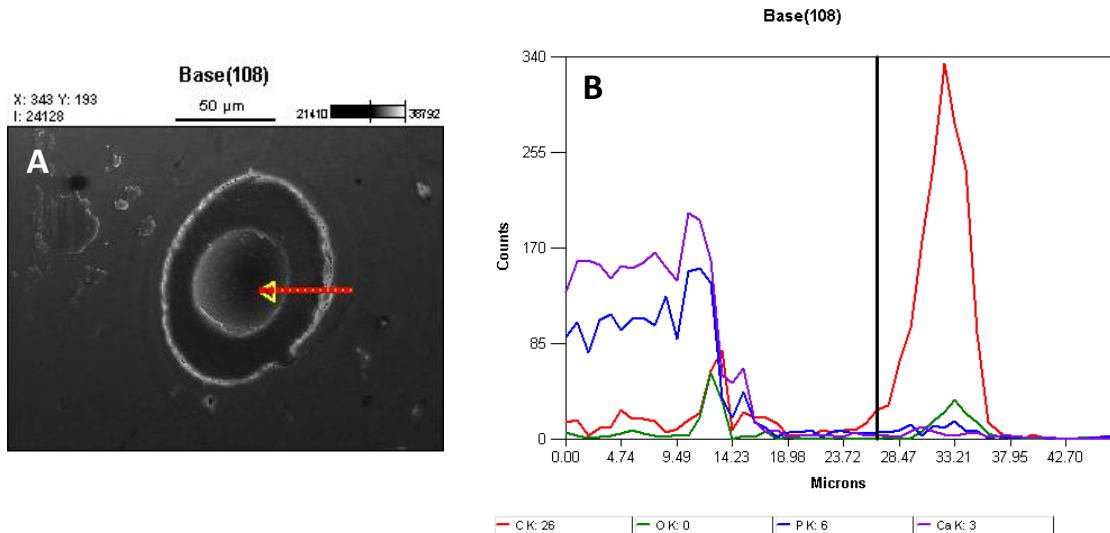


Figura 7.- Análisis SEM de una osteona secundaria en la cortical del Adulto 1. Condiciones: 15,0 kV. 600x. **A)** Fotografía en SEM de la osteona donde se realizó el análisis químico (EDS, Dispersión de Rayos X). La flecha de color representa la trayectoria y el recorrido del análisis. **B)** Perfil de concentración de la zona explicada en A. Se observan altos niveles de P y Ca en las laminillas osteónicas y altos niveles de C en la zona del lumen del canal de Havers.

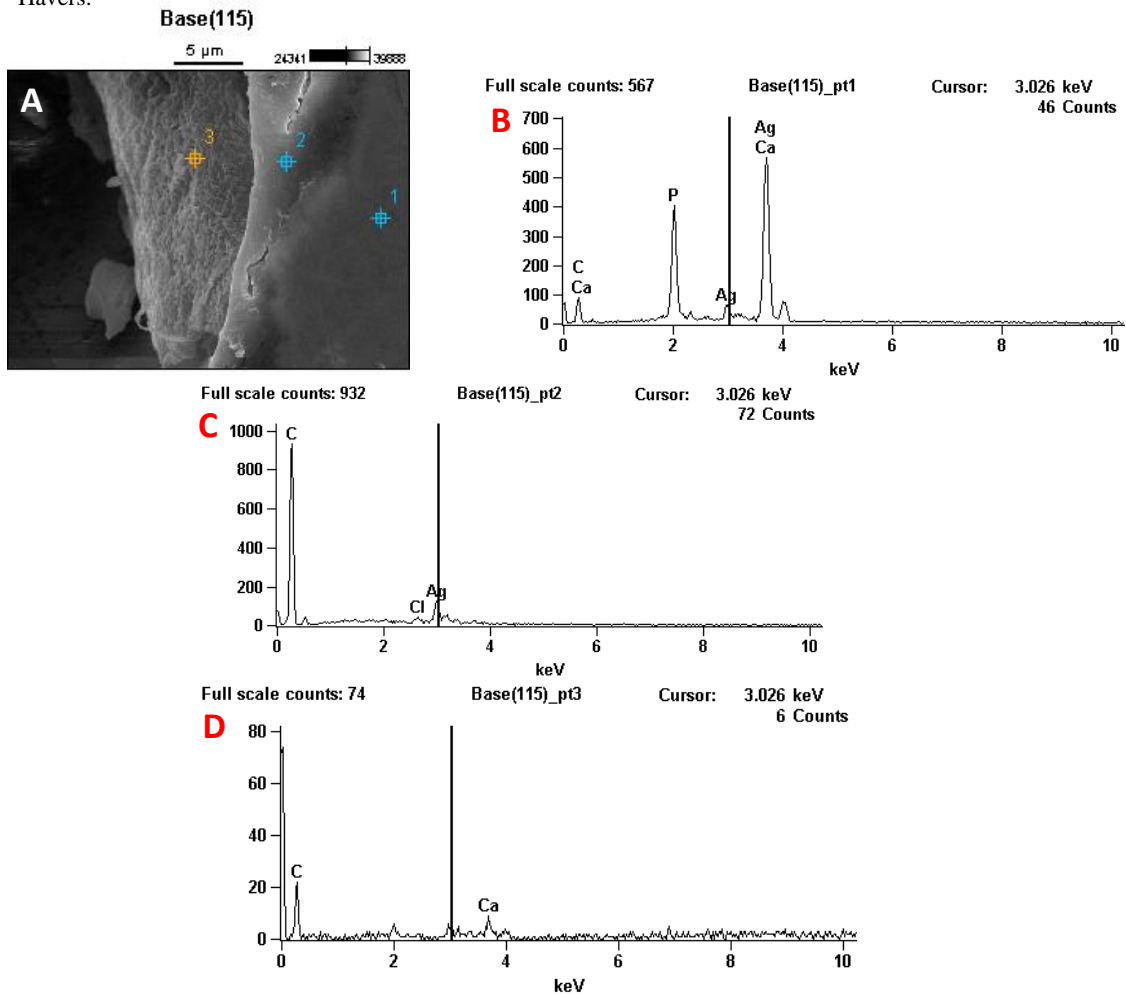


Figura 8.- Análisis mediante microscopía electrónica (SEM) de la pared del canal de Havers de una osteona secundaria de la cortical de la tibia del Adulto 1. Condiciones: 15,0 kV. 4500x. **A)** Fotografía en SEM de la pared del canal de Havers donde se realizó el análisis químico (EDS, Dispersión de Rayos X) (4500x). Los puntos de color representan el lugar exacto donde se realizó el análisis. **B)** Elementos químicos presentes en el punto de análisis 1. **C)** Elementos químicos presentes en el punto de análisis 2. **D)** Elementos químicos presentes en el punto de análisis 3

Para comprobar si en el interior de los canales de Havers aparecían estructuras momificadas, se realizó una segunda aproximación a más aumentos (Figura 8) en tres puntos, justo en el borde del canal. Pueden observarse diferencias en los niveles de los diferentes elementos en estos tres puntos. En el primero de los puntos, el más cercano a la cortical, aparecen los elementos que se habían señalado antes, calcio y fósforo (Figura 8B). En el siguiente punto, ya en la pared del canal, el elemento principal es el carbono (Figura 8C). En el tercer y último punto, situado en la pared pero en una estructura diferente (Figura 8A), solo destacan los elementos carbono y calcio si bien en menor proporción que en los casos anteriores (Figura 8D).

Por último, en vista de lo particular de encontrar tejido momificado en este tipo de restos, se analizaron las muestras en microscopía óptica de fluorescencia, ya que si el carbono observado en los análisis químicos pertenece a materia orgánica preservada, ésta emitirá una alta fluorescencia al ser excitada mediante luz. La figura 9A muestra la imagen obtenida para el individuo Juvenil en este tipo de microscopía óptica. Puede observarse que la muestra emite fluorescencia, más en unas zonas que en otras, dependiendo, probablemente, de la diferente concentración de materia orgánica. Además, tal y como muestran las figuras 9B y 9C, vemos que el nivel de preservación de materia orgánica llega hasta el nivel osteocítico.

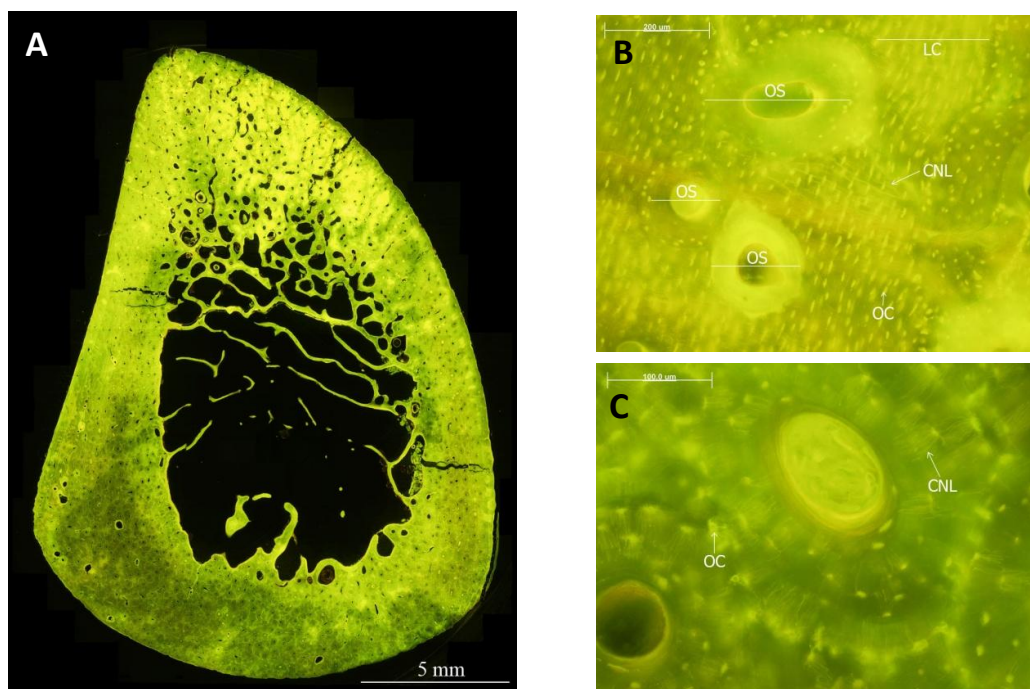


Figura 9.- Resultados de microscopía óptica de fluorescencia para el individuo juvenil. **A)** Sección histológica en fluorescencia de la tibia izquierda de un individuo juvenil (4x). **B)** Corte histológico en fluorescencia de la zona externa de la cortical de la tibia juvenil (10x). La línea de escala representa 200 µm. OS = Osteona secundaria; LC = laminillas circunferenciales; CNL = canalículos; OC = osteocitos. **C)** Corte histológico en fluorescencia de la zona externa de la cortical en la tibia juvenil (20x). La línea de escala representa 100 µm. CNL = canalículos; OC = osteocitos.

5. DISCUSIÓN

El método propuesto para la preparación de las láminas delgadas ha dado buenos resultados si bien no está exento de inconvenientes. Por un lado, si el hueso se desbasta sin ser embutido en resina durante el proceso puede absorber agua, expandirse y terminar por romperse (Ubelaker, 1974). Por esta razón, en el trabajo se siguen las indicaciones de la metodología utilizada por Ubelaker (1974) donde se utiliza una resina que se somete, además, a un proceso de vacío para que se introduzca por todos los poros. Sin embargo y debido a la elevada porosidad del material con el que trabajamos, es muy difícil que el proceso de vacío sea perfecto, ocasionando la aparición de burbujas en la resina o un reparto no uniforme de este material por toda la muestra que puede tener consecuencias no deseables. El proceso de pulido manual también es extremadamente complicado ya que exige combinar una velocidad adecuada con una presión no demasiado intensa, o el calor producido entre las dos superficies de fricción pueden provocar, cuando la sección es poco gruesa, la rotura y pérdida de la misma (Frost, 1958), o la separación de la lámina de hueso de la superficie de montaje. En trabajos posteriores se intentará resolver este último problema utilizando un adhesivo de montaje para material biológico diferente. Por otro lado, se ha evitado la utilización de ningún tratamiento químico (como el necesario para decalcificar el hueso) ni físico (como por ejemplo, sometimiento a altas temperaturas), lo que hace que la metodología sea innovadora y evite cualquier transformación en el hueso que pueda ser malinterpretada.

Uno de los principales objetivos de este trabajo consistía en, mediante el estudio de la histomorfología e histomorfometría del hueso, tratar de encontrar indicadores que permitan estimar la edad. Sin embargo, tras analizar los resultados en detalle y realizar una exhaustiva revisión bibliográfica, dicho objetivo ha pasado a un segundo plano. Crowder (2005) es de la misma opinión considerando que los métodos histológicos para la estimación de la edad son confusos en la literatura y, la mayoría de las veces, contradictorios en lo referido a las tasas de precisión y exactitud de los mismos. Además, puesto que en dichos métodos el número de individuos infantiles y juveniles estudiados es muy escaso, la aplicación de los trabajos hasta ahora publicados queda limitada a individuos adultos (Robling y Stout, 2008). Si tenemos también en cuenta la variabilidad en cuanto a estructuras histológicas y la disposición de las mismas en la cortical ósea, no cabe duda de que la fiabilidad y aplicabilidad del método queda

totalmente cuestionada, en especial en contextos bioarqueológicos, como es este caso, en el que los restos aparecen casi siempre fragmentados (Chan *et al.*, 2007). Es por ello que se ha decidido focalizar el trabajo en la descripción de los patrones de modelado, remodelación y crecimiento en los individuos infantiles y juveniles en los que, como se ha explicado anteriormente, son completamente diferentes a los de adultos. Así, los resultados histomorfométricos obtenidos por Goldman *et al.* (2009) sobre fémur humano concuerdan con los nuestros en cuanto a que tanto el área de la cortical del hueso como el área del canal medular aumentan con la edad, si bien a partir de la etapa juvenil el área ocupada por el lumen se va reduciendo. Esto sucede como resultado de un cambio en la formación de tejido óseo, ya que en individuos infantiles el nuevo hueso se deposita en el periostio y se reabsorbe en el endostio, mientras que a partir de la etapa juvenil también se empieza a depositar en el endostio (Goldman *et al.*, 2009). Por otro lado, varios autores han observado una elevada porosidad en la cortical de individuos infantiles (Streeter, 2010; Goldman *et al.*, 2009) que se corresponde con zonas de reabsorción ósea y está relacionada con los procesos de remodelación ósea (Epker y Frost, 1965). En lo respectivo a la descripción histológica del tejido, las estructuras observadas se corresponde con las descritas por otros autores (Hillier y Bell, 2007; Goldman *et al.*, 2009; Streeter, 2010; Welsch, 2010; Little *et al.*, 2011). En base a estas descripciones, Goldman *et al.* (2009) establece 5 fases de edad entre perinatal y subadulto, basándose en la histología del fémur. Tras comparar las muestras de tibia infantil y juvenil con estas categorías, el primero podría encuadrarse en la categoría de infantil joven, mientras que el segundo presenta características de juvenil inmaduro.

En el campo de los biomateriales, la espectrometría RAMAN se utiliza para comprobar la biocompatibilidad entre el hueso y los materiales utilizados en implantes (de Aza *et al.*, 1997). De esta manera, el conocimiento de la estructura mineral de los huesos y sus cambios, en función de la edad o de ciertas patologías, pueden ser muy útiles en esta línea de investigación. En lo que a la edad se refiere, la mayoría de los estudios revela cierta tendencia al aumento de cristalinidad con el paso de los años (Carden y Morris, 2000). Los estudios de Akkus *et al.* (2003) sobre fémur humano apoyan la idea, al igual que nuestros resultados, de que este cambio durante la ontogenia se debe más a un cambio en la cantidad y organización de los componentes químicos presentes en el hueso que a un cambio de dichos componentes químicos. Paschalis *et al.* (1996) y Gourion-Arsiquaud *et al.* (2009) centran sus estudios en un nivel osteónico,

encontrando también un gradiente de cristalinidad. Así, el material más antiguo en una osteona se corresponde con el más alejado del centro de la osteona y es más cristalino (Paschalis *et al.*, 1996). Extrapolando las conclusiones de los autores anteriores, podemos proporcionarle sentido al hecho de que nuestros datos revelen un gradiente de cristalinidad entre el individuo infantil y los adultos siendo los últimos mucho menos amorfos, ya que los individuos infantiles presentan una tasa de remodelación mucho mayor y por tanto el mineral es más nuevo y menos cristalino. El estudio de Akkus *et al.* (2004) realizado con fémur de rata apoya esta hipótesis, encontrando una mayor cristalinidad, en este caso en ratas adultas, que se corresponde con una estructura más ordenada. Sin embargo, para estos autores no existen diferencias entre las distintas partes de la cortical (cortical externa, media e interna) ni entre los diferentes cuadrantes de estudio del hueso (anterior, posterior, medial y lateral) (Akkus *et al.*, 2004), resultados opuestos a los obtenidos para las tibias de nuestro estudio. En este mismo trabajo, los autores exponen que el incremento en la cristalinidad también está relacionado con las propiedades mecánicas del hueso a nivel tisular, de manera que una mayor cristalinidad, junto con otras propiedades, hacen que el hueso tenga menos capacidad de deformación (Akkus *et al.*, 2004). Esta hipótesis concuerda con nuestros resultados ya que los individuos juveniles e infantiles presentan mayor capacidad de respuesta y, por tanto, menor cristalinidad que los adultos, pero también diferentes partes de un mismo hueso están sometidas a diferentes presiones mecánicas y por eso se observan diferencias de cristalinidad en distintas partes del mismo hueso.

En lo que respecta a la preservación, el análisis tafonómico es especialmente interesante en colecciones fragmentadas o mezcladas, como el caso que nos ocupa, un osario (Stodder, 2008), donde distinguir los huesos de un único individuo es imposible. Además de los factores extrínsecos al hueso que participan en el proceso tafonómico (plantas, animales, agua, agentes microbianos), las características propias del hueso tales como tamaño, forma o densidad, también afectan al estado de preservación del mismo (Stodder, 2008). Así, los diferentes tipos de tejidos óseos, su contenido mineral o su estructura, por estar relacionados con la anatomía, y en definitiva, con la biomecánica del hueso, intervienen en la preservación (Lyman, 1994). Las propiedades biomecánicas de un hueso vienen determinadas por la densidad ósea, que se define en función del grado de mineralización de una osteona y la porosidad por unidad de volumen de hueso (Burr, 1980; citado en Lyman, 1994). Según esto, el hueso esponjoso o trabecular es

menos rígido que la zona cortical compacta (Currey 1984; citado en Lyman, 1994), por lo que presenta una preservación peor. Es conveniente analizar también la fase diagenética en la que se encuentran los restos del estudio. Puesto que no se han encontrado microfisuras radiales en los canales de Havers (Pfretzschner, 2004), suponemos que nos encontramos en una diagénesis temprana. Además, los procesos de descomposición de esta fase están regulados tanto por la presencia de compuestos orgánicos como por la de la propia hidroxiapatita (Pfretzschner, 2004), elementos presentes en nuestras muestras. Por último los altos niveles de carbono encontrados en los canales de Havers, pueden corresponderse con estructuras orgánicas, como vasos sanguíneos o eritrocitos (Graf, 1949; citado en Stout, 1978), preservadas. Si bien el mayor componente orgánico que suele persistir en el hueso es el colágeno (Stout, 1978) y es este elemento el utilizado para los estudios de ADN antiguo, la posibilidad de que se hayan preservado otros elementos orgánicos, como parecen indicar nuestros resultados, podría proporcionar otra de las fuentes de las que obtener material genético inalterado.

6. CONCLUSIONES

- La metodología utilizada para la preparación de láminas delgadas de hueso es apropiada, ya que permite observar, sin ningún problema, todas las estructuras histológicas presentes en el tejido óseo sin necesidad de ningún tratamiento químico o físico previo.
- A la vista de los resultados obtenidos, encontrar unos indicadores fiables que permitan estimar, a partir de la histología e histomorfometría del hueso, la edad de un individuo es demasiado complicado, por lo que se requieren más datos y un mayor conocimiento acerca de dicha estructura antes de abordar este tema.
- Debido a los procesos de crecimiento, modelado y remodelación, tanto la cortical del hueso como el canal medular van aumentando de tamaño, si bien ambas partes del hueso siguen una tasa de cambio diferente, por lo que en diferentes edades, la contribución al total de la sección de cada una de las partes es diferente.
- La elevada porosidad presente en la cortical del hueso infantil es debida a los procesos anteriormente citados, ya que es en este individuo donde la tasa de remodelación es mayor.

- La parte mineral de la matriz del tejido óseo sufre transformaciones durante la ontogenia, sucediéndose un aumento en la cristalinidad u organización de los elementos presentes en dicha matriz con la edad.
- En el mismo hueso, hay diferencias de cristalinidad en diferentes zonas dependiendo, seguramente, de factores como la presión mecánica a la que estén sometidas, y entre las distintas partes de la cortical.
- La colección de estudio ha preservado su ultraestructura con detalle, por lo que se puede decir que el estado de preservación es bueno, llegando a encontrarse posibles restos de materia orgánica momificada a nivel osteocítico.

7. AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer al Departamento de Biología, así como al Instituto de Cerámica y Vidrio (ICV-CSIC), la amabilidad mostrada al permitirme disponer del material y los aparatos necesarios para este estudio. Al Departamento de Histología por la ayuda prestada con la microscopía y fluorescencia. Al arqueólogo, Enrique Gil, por habernos proporcionado la colección de estudio. A Armando y Josefina, por darme la oportunidad de participar en algo tan interesante como es la Paleohistología. A Miguel Ángel Rodríguez, por ayudarme con mis escasos y oxidados conceptos de química y mostrarme todo un abanico de técnicas de estudio. A Marisa Rubio, por enseñarme todos los secretos del pulido. A mis compañeros de laboratorio, amigos, familia, Iñigo, y toda la gente que soporta mis manías e intenta entender mis pasiones.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akkus O, Polyakova-Akkus A, Adar F, Schaffler MB. Aging of microstructural compartments in human compact bone. *Journal of Bone and Mineral Research* 2003; 18 (6): 1012-1019.
- Akkus O, Adar F, Schaffler MB. Age-related changes in physicochemical properties of mineral crystals are related to impaired mechanical function of cortical bone. *Bone* 2004; 34 (3): 443-453.
- de Aza PN, Guitián F, Santos C, de Aza S, Cuscó R, Artús L. Vibrational properties of calcium phosphate compounds. 2. Comparison between hydroxyapatite and β -tricalcium phosphate. *Chemistry of Materials* 1997; 9: 916-922.

- Burton P, Nyssen-Behets C, Dhem A. Harvesian bone remodelling in human fetus. *Acta Anatomica* 1989; 135: 171-175.
- Caeiro-Rey JR, Dapía-Robleda S, Vázquez-Fernández E, García-Castellanos JM. Aplicación de la estructura RAMAN al estudio de la ultraestructura ósea en hueso osteoporótico. *Acta Ortopedica Gallega* 2006; 2 (1): 3-6.
- Cambra-Moo O. Bioestratinomía y Fosildiagénesis de Arcosaurios. Aplicación de la Actuotafonomía al estudio de la influencia paleobiológica en el proceso tafonómico. [Tesis Doctoral]. Madrid: Universidad Autónoma de Madrid; 2006.
- Carden A, Morris MD. Application of vibrational spectroscopy to the study of mineralized tissue (review). *Journal of Biomedical Optics* 2000; 5(3): 259-268.
- Chan AHW, Crowder CM, Rogers TL. Variation in cortical bone histology within the human femur and its impact on estimating age at death. *American Journal of Physical Anthropology* 2007; 132 (2): 80-88.
- Epker BN, Frost HM. The direction of transverse drift of actively forming osteons in human rib cortex. *The Journal of Bone and Joint Surgery* 1965; 47: 1211-1215.
- Frost HM. Preparation of thin undecalcified bone sections by rapid manual method. *Biotechnic and Histochemistry* 1958; 33 (6): 273-277.
- Gilbert SF. *Developmental biology*. 7 ed. Sunderland: Sinauer Associates; 2003.
- Goldman HM, McFarlin SC, Cooper DML, Thomas CDL, Clement JC. Ontogenetic patterning of cortical bone microstructure and geometry at the human mid-shaft femur. *The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology* 2009; 292: 48-64.
- Gourion-Arsiquaud S, Burket JC, Havill LM, DiCarlo E, Doty SB, Mendelsohn R *et al.* Spatial variation in osteonal bone properties relative to tissue and animal age. *Journal of Bone and Mineral Research* 2009; 24 (7): 1271-1281.
- Hillier ML, Bell LS. Differentiating human bone from animal bone: a review of histological methods. *Journal of Forensic Sciences* 2007; 52 (2): 249-263.

- Little N, Rogers B, Flannery M. Bone formation, remodeling and healing. *Surgery* 2011; 29 (4): 141-145.
- Locke M. Structure of long bones in mammals. *Journal of Morphology* 2004; 262 (2): 546-565.
- Lyman RL. Vertebrate taphonomy. Cambridge: Cambridge Manuals on Archaeology; 1994.
- Mohsin S, O'Brien FJ, Lee TC. Osteonal crack barriers in ovine compact bone. *Journal of Anatomy* 2006; 208 (1): 81-89.
- O'Brien FJ, Taylor D, Lee TC. The effect of bone microstructure on the initiation and growth of microcracks. *Journal of Orthopaedic Research* 2005; 23: 475-480.
- Paschalis EP, DiCarlo E, Betts F, Sherman P, Mendelsohn R, Boskey AL. FTIR microspectroscopic analysis of human osteonal bone. *Calcified Tissue International* 1996; 59 (6): 480-487.
- Penel G, Leroy G, Leroy N, Behin P, Langlois J *et al.* Spectrometrie RAMAN appliquee aux tissus calcifies et aux biomateriaux phospho-calciques. *Bulletin du Groupement international pour la recherche scientifique en stomatologie & odontologie* 2000; 42: 55-63.
- Peters F, Schwarz K, Epple M. The structure of bone studied with synchrotron X-ray diffraction, X-ray absorption spectroscopy and thermal analysis. *Thermochimica Acta* 2000; 362: 131-138.
- Pfeiffer S, Crowder C, Harrington L, Brown M. Secondary osteon and Haversian canal dimensions as behavioral indicators. *American Journal of Physical Anthropology* 2006; 131 (4): 460-468.
- Pfretzschner HU. Fossilization of Haversian bone in aquatic environments. *Comptes Rendus Palevol* 2004; 3 (6): 605-616.
- Robling AG, Stout SD. Histomorphometry of human cortical bone: applications of age estimation. En Katzenberg MA y Saunders SR, editores. *Biological anthropology of the human skeleton*. 2ed. New Jersey: John Wiley & Sons; 2008. p. 148-182.

- Ross MH y Pawlina W. Histología. 5 ed. Buenos Aires: Medica Panamericana; 2007.
- Scheuer L y Black S. Developmental juvenile osteology. London: Academia. Press Limited; 2000.
- Sedlin ED, Frost HM. Variations in rate of human osteon formation. Canadian Journal of Biochemistry and Physiology 1963; 41: 19-22.
- Skedros JG, Holmes JL, Vajda EG, Bloebaum RD. Cement lines of secondary osteons in human bone are not mineral-deficient: new data in a historical perspective. The Anatomical Record Part A: Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology 2005; 268A (1): 781-803.
- Stodder ALW. Taphonomy and the nature of archaeological assemblages. En Katzenberg MA y Saunders SR, editores. Biological anthropology of the human skeleton. 2ed. New Jersey: John Wiley & Sons; 2008. p. 71-114.
- Stout SD. Histological structure and its preservation in ancient bone. Current Anthropology 1978; 19 (3): 601-604.
- Stout SD. Methods of determining age at death using bone microstructure. En Katzenberg MA y Saunders SR, editores. Skeletal biology of past people: Research Methods. New York: Willey-Liss; 1992. p. 21-35.
- Streeter M. Histological age estimation in subadults. En Latham KE y Finnegan M, editores. Age estimation of the Human Skeleton. 1ed. Illinois: Charles C Thomas; 2010. p. 232-242.
- Ubelaker DH. Reconstruction of demographic profiles from ossuary skeletal samples. A case study from the Tidewater Potomac. Washington: Smithsonian Institution Press; 1974. (Smithsonian Contributions to Anthropology 18).
- Welsch U. Histología. Madrid: Medica Panamericana; 2008.
- White TD, Folkens PA. The human bone manual. 1ed. London: Academic Press, Elsevier; 2005.